

PCT/CZ00/00064
08.09.00

ČESKÁ REPUBLIKA

REC'D 17 OCT 2000

WIPO PCT

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

4

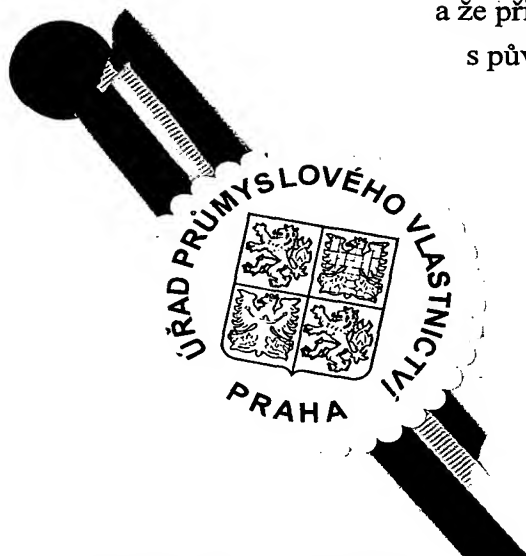
potvrzuje, že
BIOPHARM VÝZKUMNÝ ÚSTAV BIOFARMACIE A VETERINÁRNÍCH LÉČIV, A.S.,
Jílové u Prahy, CZ

podal(i) dne 08.09.1999

příhlášku vynálezu značky spisu PV 1999 - 3186

a že připojený popis a 12 výkresů se shoduje úplně
s původně podanými přílohami této přihlášky.

duková
Za předsedu: Ing. Hošková Marta



V Praze dne 11.10.2000

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Způsob konstrukce transgeni drůbeže

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu konstrukce transgeni drůbeže využitím prapohlavních spermatogoniálních buněk pro přenos genetické informace u drůbeže.

Dosaadní stav techniky

Biotechnologický výzkum v oblasti transgeni drůbeže není zdaleka tak úspěšný jako tomu je u savců. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmnožovací ústrojí ptáků. Ptáci zygota na rozdíl od savců není přístupná a je spojena s mimorádně velkým zloukovým vakem. Hmota žloutků brání identifikaci pronukleů, v procesu oplodnění dochází k polyspermii a není možné určit které prvojádro se účastní tvorby embrya. Proto například přímá mikroinjekce do prvojádra používána u myši je u drůbeže téměř nemožná. Práce v uvedené oblasti se u drůbeže proto zaměřily na manipulace s ještě nediferenciovanými drůbežními buňkami, at již se jedná o blastodermální buňky, primordiální gonocyty či prapohlavní, spermatogoniální buňky.

Využití prapohlavních, spermatogoniálních buněk při konstrukci transgeniálních jedinců jako první popsal u myši Brinster, L.R. Avarbock, M.R. (1994) Germ-line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11303-11307. Jedná se v podstatě o novou oblast možné produkce zárodečných chimér a to částečnou nebo úplnou destrukci pohlavních buněk ve varlatech jedince a jejich opětovnou rekolonizaci pohlavními buňkami jiného jedince. U drůbeže tato metoda nebyla popsána.

Prvním krokem zvládnutí výše uvedené techniky je sterilizace varlat akceptorů, neboť destrukce právě těchto prapohlavních spermatogoniálních buněk (progenitorů spermií) není snadná a použití např. busulphanu není zcela odpovídající a dochází po jeho použití buď pouze k částečné sterilizaci donora (Vick, L. Luke, G. Simkiss, K. (1993) Germ line chimerae can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization. J. Reprod. Fert., 98, 637-641, nebo při použití vyšších dávek naopak k jeho celkové retardaci - development of the chicken embryos, Vet. Med.-Czech, 43, 105-109, což v žádném případě není žádoucí.

Pouze fakt, že uvedený způsob přenosu prapohlavních spermatogoniálních buněk z jednoho jedince do druhého je funkční, je nesmírně cenný a kromě této vlastní skutečnosti nesmírně zajímavý právě při tvorbě transgenní drůbeže. Prapohlavní, spermatogoniální buňky lze snadno před vlastní implantací do kohouta akceptora *in vitro* transfekovat cizorodou genetickou informací, která bude dál z 1/2 přenášena na potomstvo v F1 generaci. Takto pravděpodobně bude otevřena reálná cesta pro využití drůbeže (drůbežního vejcovodu) jako bioreaktoru pro produkci specifických např. pro farmaceutický průmysl cenných proteinů.

Původci vynálezu bylo provedeno velké množství pokusů na ověření způsobu podle vynálezu, z nichž některé byly vybrány do následující příkladové části, která je dále podložena přílohou grafů, stránkou obrázků.

Příklady provedení

Příklad 1

– úplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován v boxu tak, aby bylo možné zevně z boční strany těla provést ozáření přesně na plochu velikosti varlat pomocí gama paprsků. Jako vhodný se ukázal přístroj Theratron T1000 a isotop ^{60}Co . Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje 5x za sebou v týdenním intervalu ozářena minimálně dávkou 8 Gy. Aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na zdravotním stavu a chovné kondici kohouta zhruba po 90 dnech po posledním ozáření ztratí kohout trvale schopnost produkce spermií a je připraven po uvedené době ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora, viz graf č. 1 a graf č. 2. a obrázek č. 1 v příloze.

– příprava a aplikace prapohlavních, spermatogoniálních buněk kohouta donora

Dospělému kohoutu inbrední linie plemene Minorka černá (černá barva peří způsobena recesivní alelou ii) produkujícím ejakulát byl pomocí biopsie odebrán vzorek tkáně z varlat obsahující jeho prapohlavní spermatogoniální buňky. Tyto buňky byly umístěny po dobu 4 hodin do média M 199 Sigma (obsahující 10 % hmotn. Fetal bovine serum, 2 % hmotn. chicken serum, 1 % hmotn. pyruvate sodium, 1 % hmotn. gentamycin) při poměru ředění 1 : 1 s uvedeným médiem. Inkubace buněk probíhala při standardních podmínkách: při 5 % hmotn. obsahu oxidu uhlíkového a při teplotě 40 °C. Poté byly prapohlavní spermatogoniální buňky v celkovém objemu suspenze 200 mikrolitrů aplikovány pomocí injekční sříkačky do každého ozářeného varlate kohouta

Podstata vynálezu:

Příprava transgenní drůbeže způsobem podle vynálezu je snadná a se stoprocentním výsledkem, protože spermatogoniální buňky kohouta donora mohou být transfekovány potřebnou žádanou genetickou informací a tak po jejich úspěšné implantaci do varlat kohouta akceptora dojde takto k tvorbě transgenního kohouta, který po inseminaci, či při přirozené plemenitbě bude z 1/2 předávat genetickou informaci na svoje potomstvo.

– funkční produkce ejakulátu po přenesení prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora

– biologická testace přenesených prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora

Tato černá kuřata jsou jasným důkazem, že implantace a kolonizace prapohlavních, spermatogoniálních buněk kohouta donora byla úspěšná, protože vylihnu-li se pouze černá nebo žíhaná kuřata, to ve své podstatě znamená nepřítomnost dominantní alely II, ale pouze přítomnost recesivní alely ii, tedy pouze přítomnost funkčních spermií kohouta s recesivním založením barvy peří ii, tedy v tomto případě s černou barvou peří, viz schéma č.1 v příloze.

-neúplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován po ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 18 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermií (oproti kontrole, graf č.9 a č.10), naopak po 150 dnech se koncentrace (viz.graf č.3) a motilita (graf č.4) vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

Příklad 3

-neúplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva při způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován při ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 22 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermií, naopak po 160 dnech se koncentrace (viz.graf č.5) a motilita (graf č.6) sice o něco nižší vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

Příklad 4

-neúplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva při způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován pro ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 26 Gy. Tato dávka se projevila negativně na zdravotním stavu kohouta, místo ozáření bylo na kůži lehce zduřelé a načervenalé kohout jevil známky únavy ještě několik dnů po ozáření. Kohout ztratil téměř po 160 dnech schopnost produkce spermií, viz graf č.7, ale produkce ejakulátu v nepatrné míře pokračovala a spermie vykazovaly i určitou motilitu, viz graf.č.8. Bylo možné konstatovat, že tato dávka byla poměrně vysoká, zatížila zdravotní stav kohouta, ale nebyla z pohledu ještě okračující produkce ejakulátu dostatečná a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

Průmyslová využitelnost

Opakovaným ozářením gamma paprsky varlat kohouta akceptora a implantací cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora do neporušených sterilních varlat kohouta akceptora dojde u něj k opětovné produkci oplození schopných spermií s celou genetickou informací od kohouta donora. Po inseminaci slepic těmito produkovanými spermiemi vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora. Uvedený postup bude využíván průmyslovým způsobem drůbežářskými šlechtitelskými a biotechnologickými společnostmi.

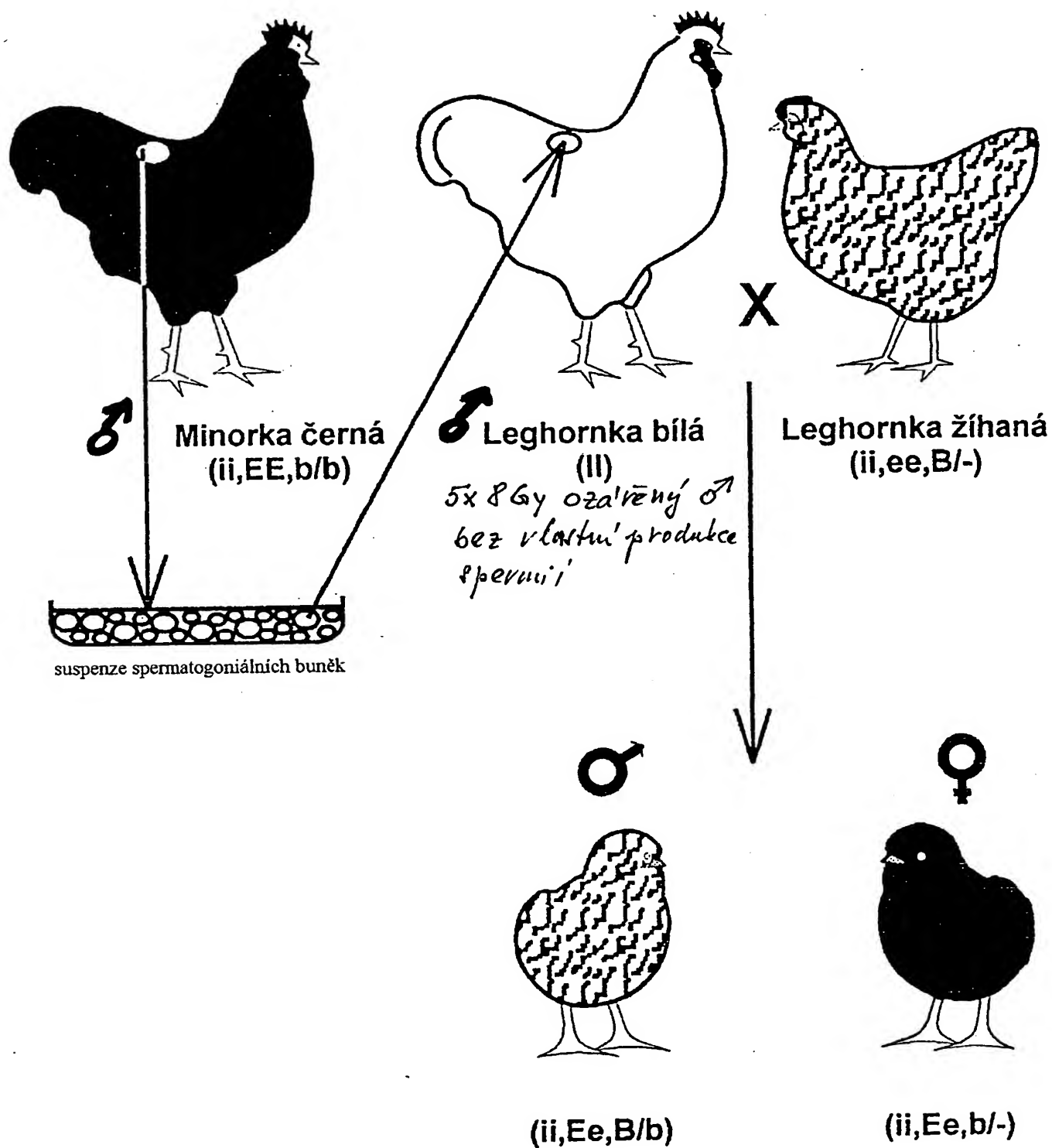
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob konstrukce transgenní drůbeže, zejména přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pouze varlata kohouta akceptora zevně opakovaně ozáří gama paprsky, načež se do jeho neporušených sterilních varlat v intervalu 60 dní až 2 let od posledního ozáření implantují cizí prapohlavní spermatogoniální buňky kohouta donora, z nichž se dále produkují oplození schopné spermie s celou genetickou informací od kohouta donora, z kterých po inseminaci slepic vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se varlata kohouta akceptora ozáří 3x až 9x gama paprsky o síle alespoň 8 Gy vždy v intervalu 3 až 9 dní.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se varlata kohouta akceptora ozáří 5x gama paprsky o síle 8 Gy vždy v týdenních intervalech.

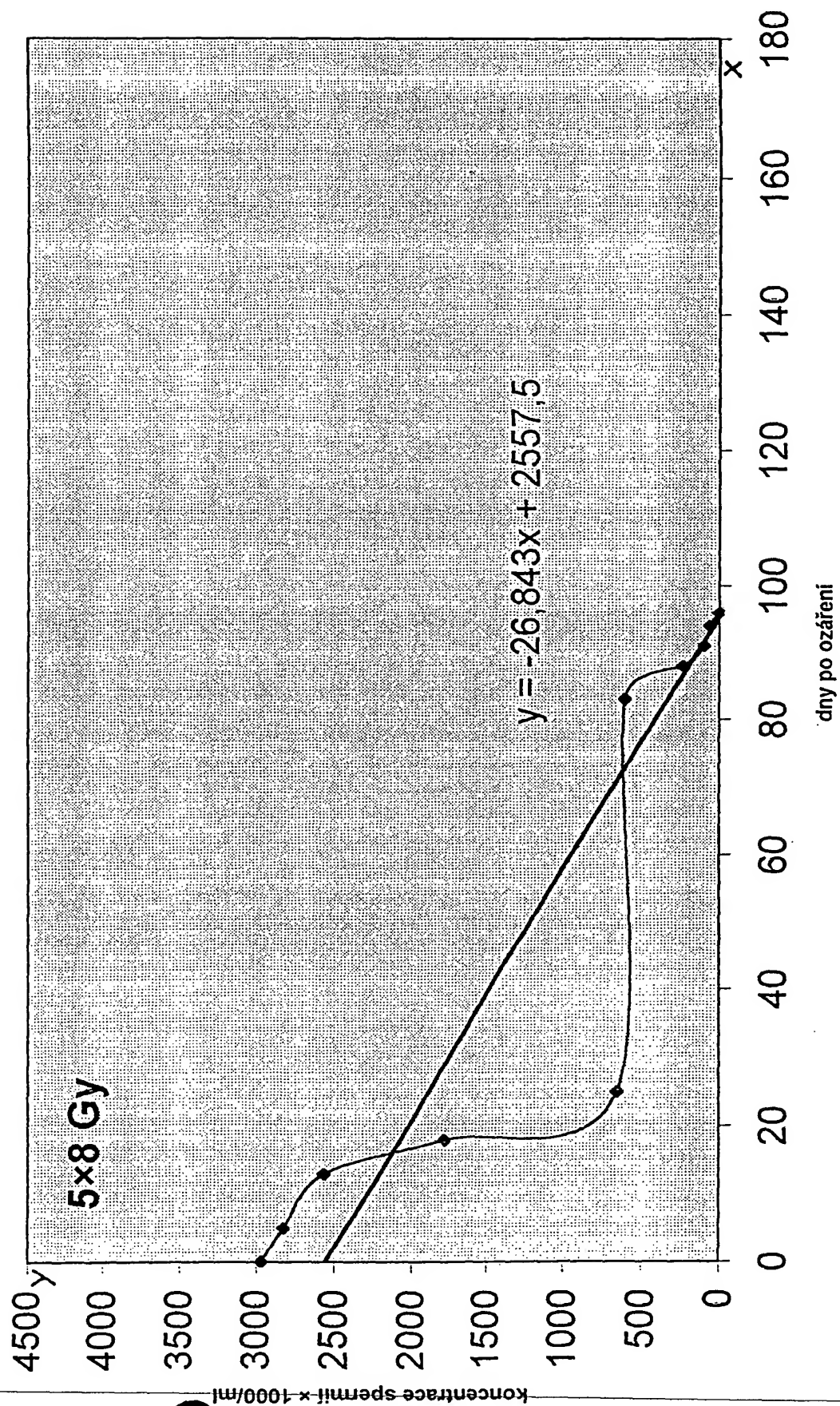
7

88

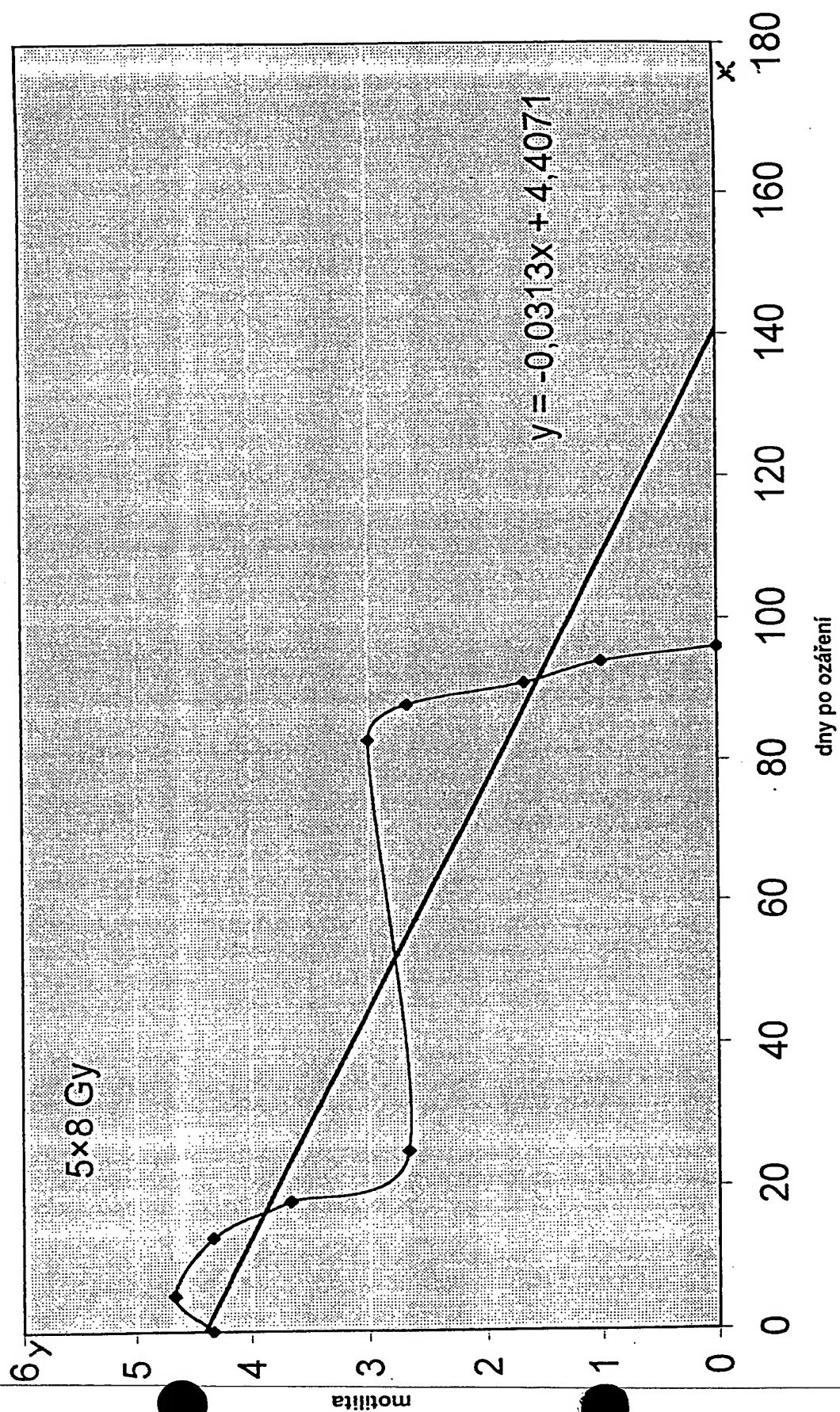
schéma č.1



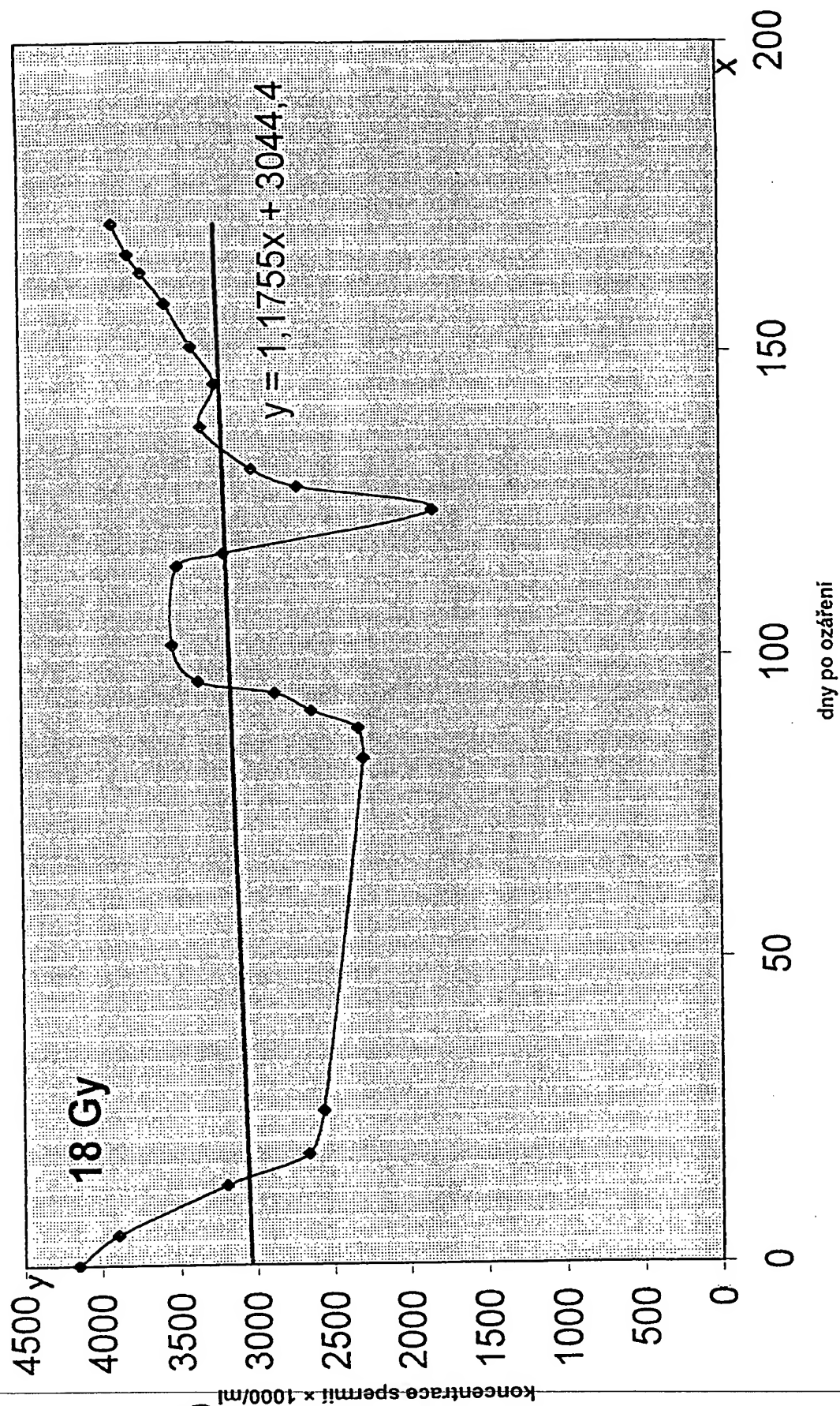
Graf č. 1



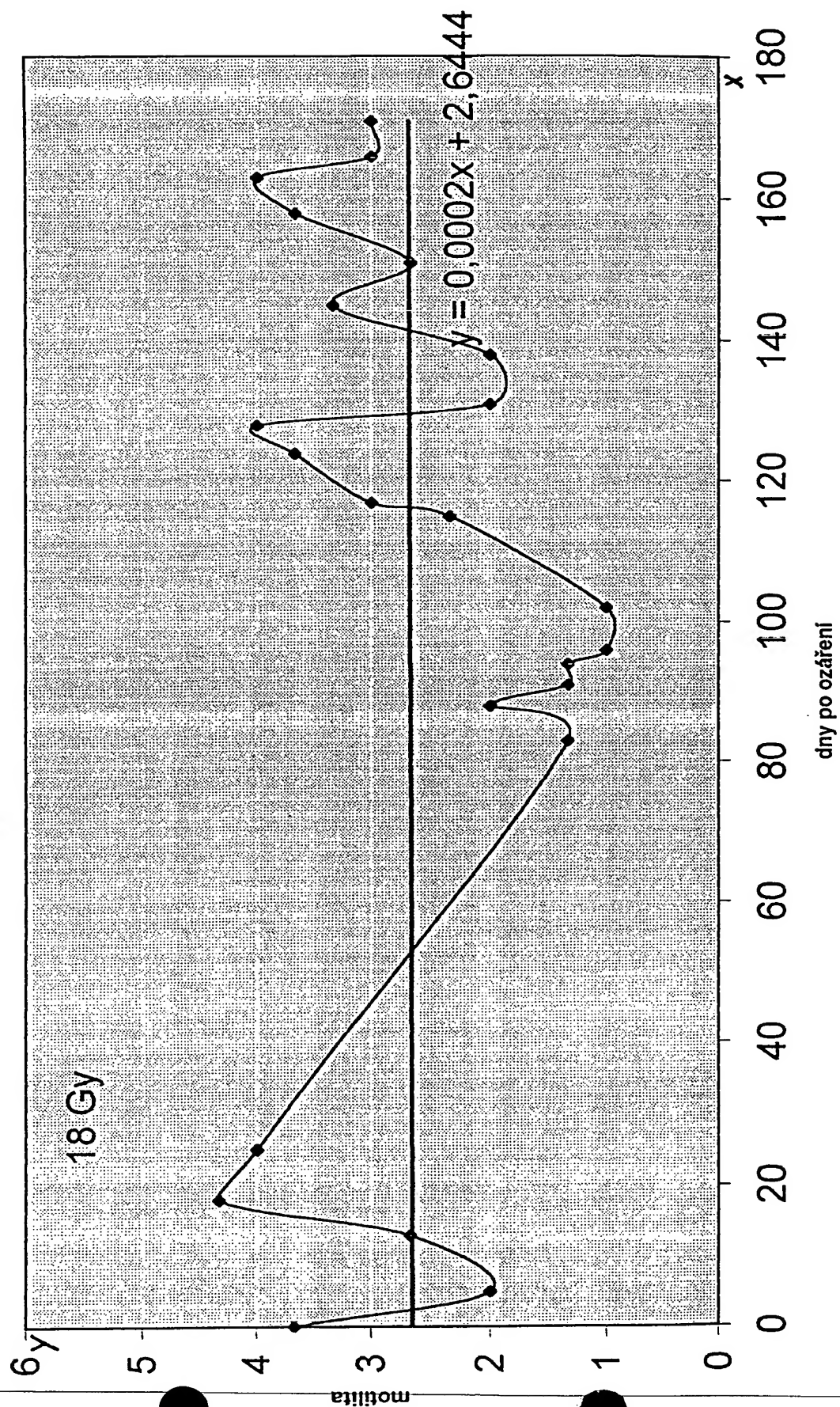
Graf č. 2



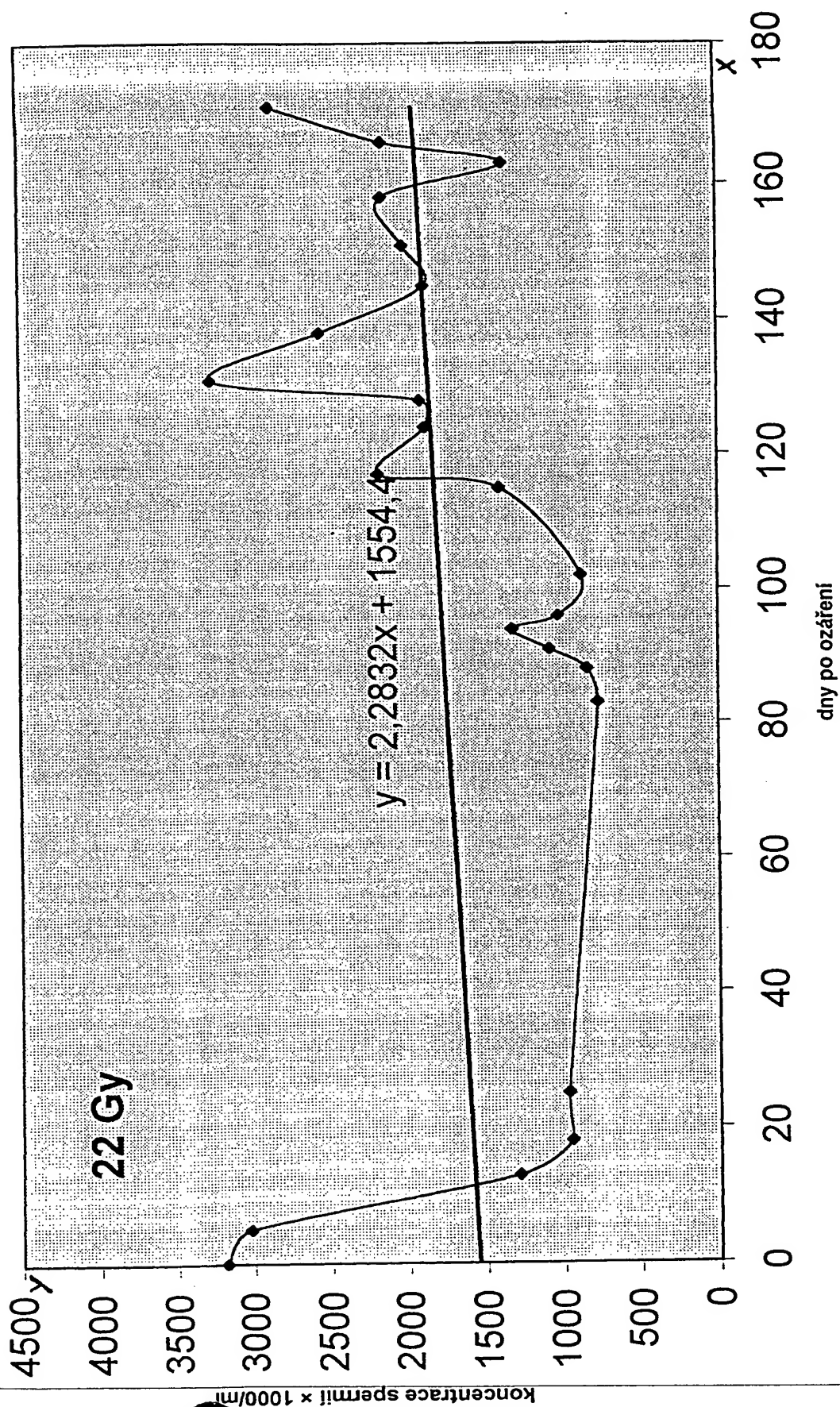
graf č.3



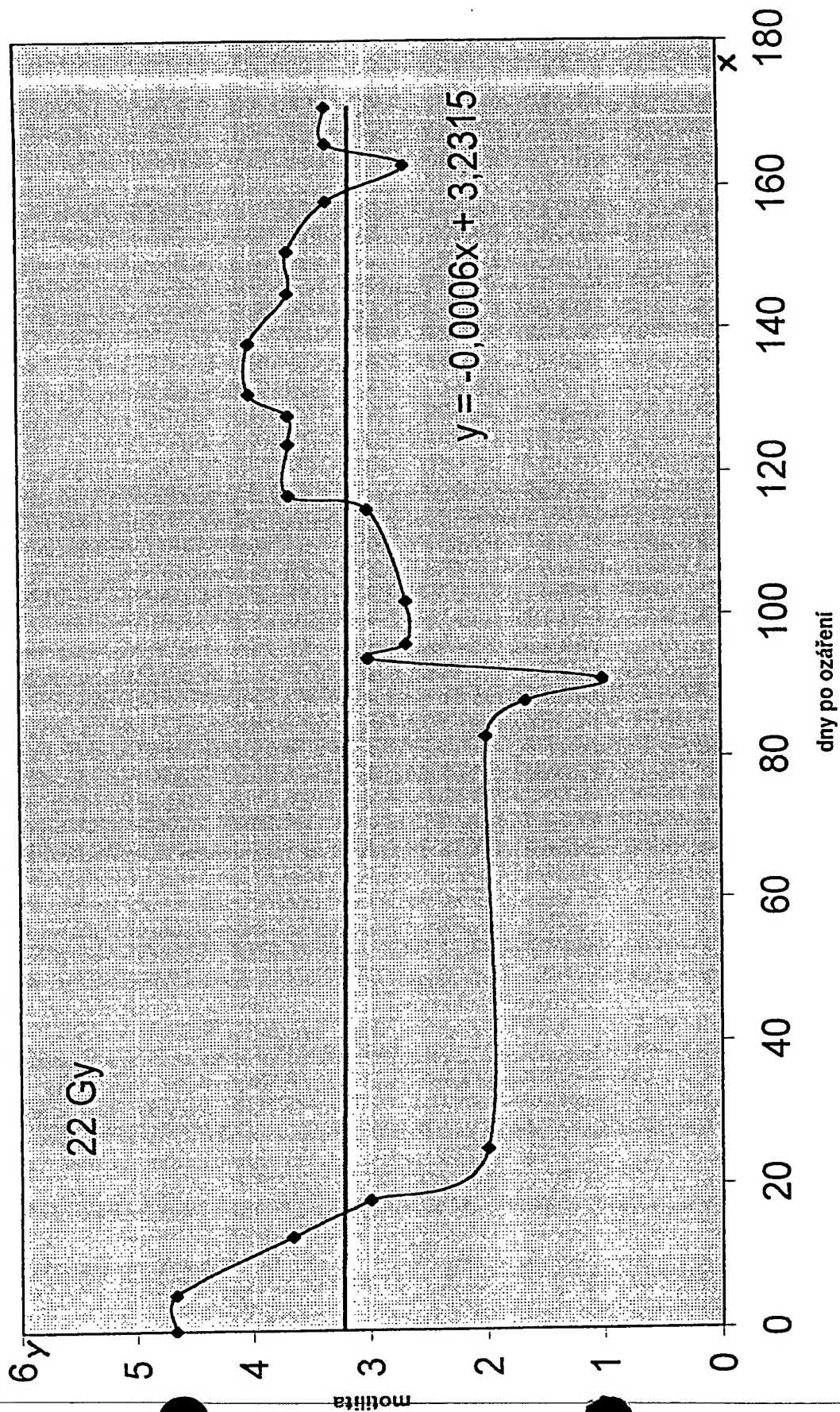
Graf č. 4



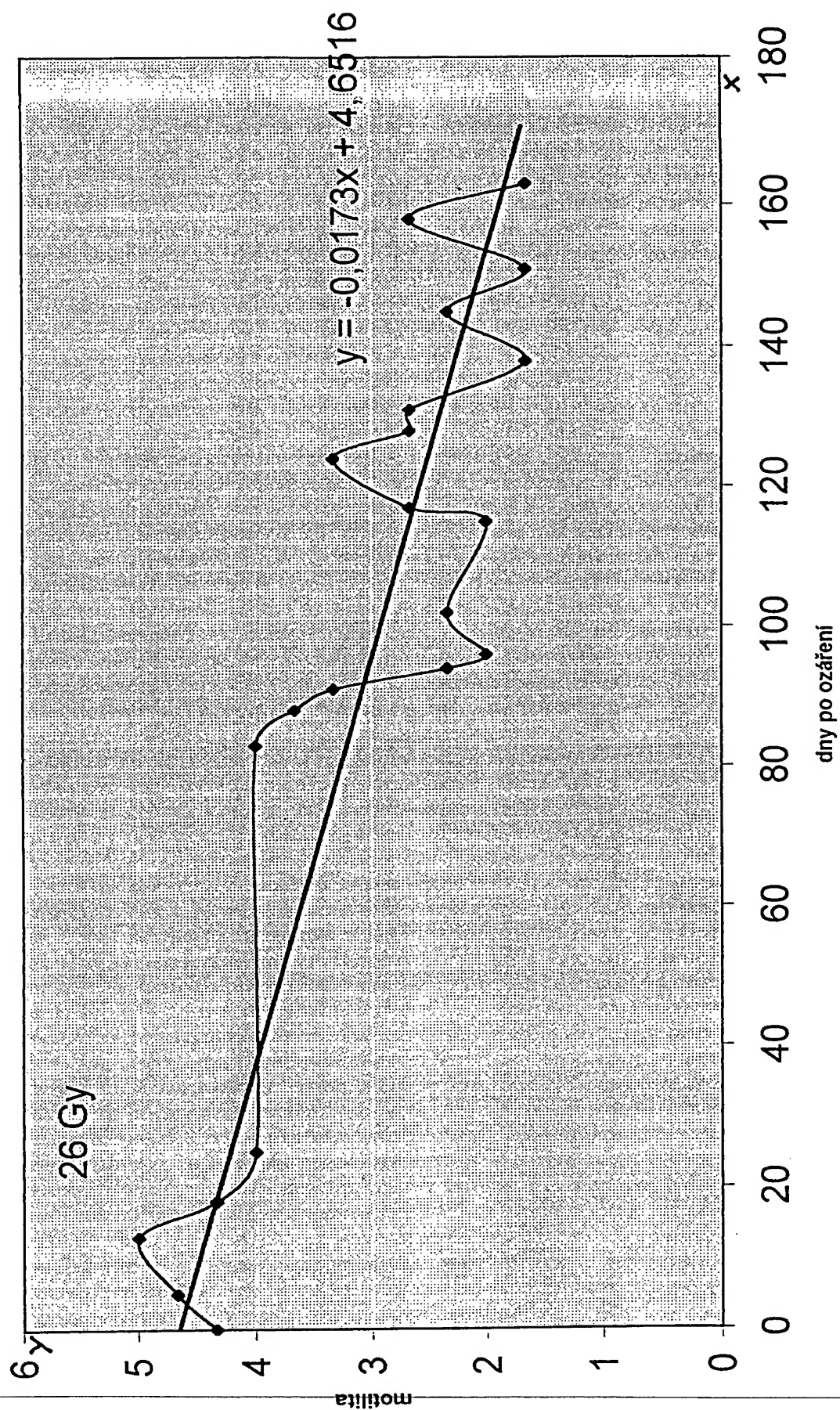
Graf č. 5



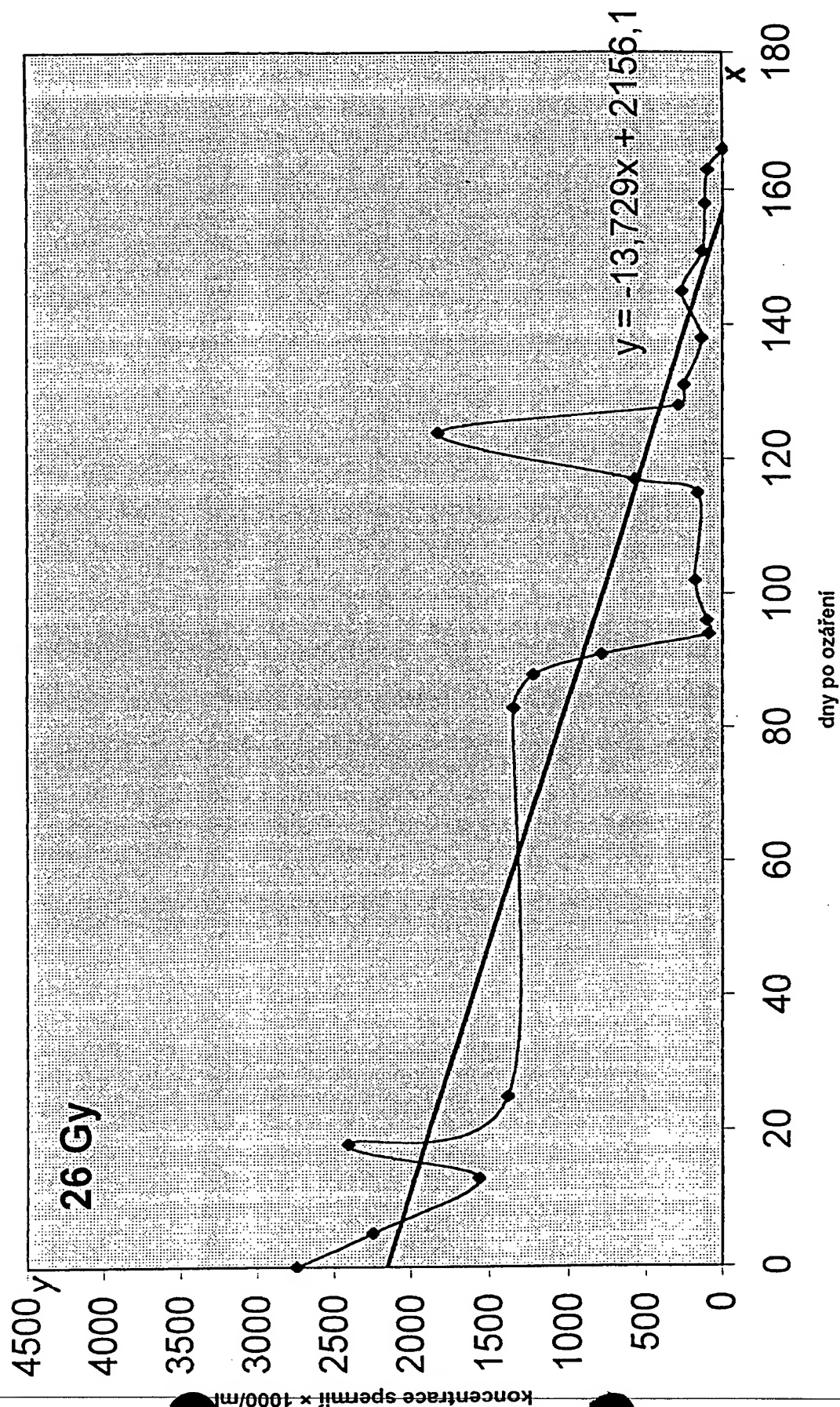
Graf č. 6



Graf č. 8



Graf č. 7



Y-axis: koncentrace spermií x 1000/ml (0 to 4500)
X-axis: dny po ozáření (0 to 180)
Regression line: $y = -0,0057x + 3957,7$

koncentrace spermii x 1000/ml

Graf č. 10 - kontrola

